

# 正交实验选择嗜碱细菌降解木质素的最优综合培养条件

罗宇煊, 张甲耀\*, 龚利萍, 管筱武(武汉大学化学与环境科学学院, 武汉 430072, E-mail: enviro@whu.edu.cn)

**摘要:**在复合碳源的碱性液体培养条件下( $\text{pH} \approx 10.5$ ), 用正交实验法对影响嗜碱木质素降解细菌 6 号菌株降解木质素的 7 种单因素培养条件进行了优化. 结果表明, 第 1 碳源用量等单因素在不同程度上对 6 号菌株产生的木质素降解酶 Laccase 和 MnP 以及木质素降解率都有一定促进作用. 正交实验表明, 其中第 1 碳源用量和 T-80 用量是显著性的影响因素, 7 种单因素的最佳综合水平为:  $37^\circ\text{C}$  静置培养 10d、第 1 碳源(蔗糖)  $1\text{g/L}$ 、氮源  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $1.2\text{g/L}$ 、培养基 70 ml/250 ml 锥形瓶、初始 pH 值 10.6 和第 2 碳源接种后第 4d 加入、添加 0.3% 的表面活性剂 T-80.

**关键词:**嗜碱细菌; 单因素培养条件; 木质素生物降解; 正交实验

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2001)05-04-0095

## Optimization of Synthetic Culture Condition on Lignin Biodegradation Ability of Alkaliphilic Ligninolytic Bacteria Using Orthogonal Experimental Design

Luo Yuxuan, Zhang Jiayao\*, Gong Liping, Guan Xiaowu(Institute of Chemistry & Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China E-mail: enviro@whu.edu.cn)

**Abstract:** The effects of seven single culture factors on lignin biodegradation ability of alkaliphilic ligninolytic bacteria strain 6 in alkaline liquid medium ( $\text{pH} \approx 10.5$ ) with compounded carbons were optimized using orthogonal experiments. The result showed the seven single culture factors promote the activities of Laccase and MnP and the degradation rate of wheat straw lignin in varying degrees. The synthetic result was analysed. The optimal synthetic condition was static culture (10 days culture period),  $37^\circ\text{C}$ , the initial pH 10.6,  $1\text{g/L}$  sugar (the starting carbons), wheat straw lignin (the second carbons, wheat straw powder  $20\text{g/L}$ , added into on the fourth day after inoculation),  $1.2\text{g/L}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (nitrogen), 0.3% detergent T-80, 70 ml medium/250 ml flask.

**Key words:** alkaliphilic bacteria; single culture condition; lignin biodegradation; orthogonal experiment

在真菌降解木质素的研究中, 人们采用了各种各样的调控方法以提高木质素降解能力, 这些方法对嗜碱木质素降解菌可能具有同样的调控作用<sup>[1]</sup>, 因此以这些研究为基础, 为提高 6 号菌株产酶及降解木质素的能力, 在以前的研究基础上进一步研究以下 7 种单因素综合培养条件下对嗜碱木质素降解菌 6 号菌株产酶及降解木质素的调控作用<sup>[2]</sup>. 本研究建立在以前选定的复合碳源条件下, 包括: 第 1 碳源用量、培养基体积、培养基初始 pH 值、不同含量的吐温 80 (Tween-80)、诱导物 2,2'-连氮-3-乙苯-二噻唑-6 硫酸(2,2'-azirnor bis (3-ethylbenz-thiazoline)-6-sulfonic acid, ABTS) 的添加与否、培养温度和第 2 碳源加入时间等因素. 因影响因素较多, 期望通过设计合理的正交实验  $L_{16}(4^4 \times$

$2^3)$ , 在较少的实验次数内得到较多的信息, 从而在一定程度上避免了选择综合培养条件的盲目性.

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

由本实验室筛选的嗜碱木质素降解菌 6 号菌株.

#### 1.2 原料

将麦草(湖北省农业科学院提供)剪成  $2 \sim 4\text{cm}$  的小段, 用 DWF-100 型电动植物粉碎机粉碎成麦草粉.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29677012)

作者简介: 罗宇煊(1975~), 男, 硕士.

收稿日期: 2001-01-18

\* 通讯联系人

1.3 培养基和培养方法

基础培养溶液为:蔗糖(第1碳源)1g/L,麦草粉20g/L(第2碳源,接种后第3d加入),NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>1.2g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.5g/L,MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O0.25g/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O0.1g/L,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>10g/L(单独灭菌),pH≈10.5<sup>[3]</sup>.以基础培养溶液为基础,依据正交实验分配分别加入不同组分或者改变某些组分的用量和物理培养条件,分别配成不同的正交组液体培养基.除物理条件被改变外,其它各组实验均采用每250ml锥形瓶装50ml培养液,将菌株接种于各种培养液(每瓶接种1%菌悬液,各做3个重复2个批次),1个批次在37℃下静置培养4d后,取5ml,4000r/min离心15min,取上清液作为粗酶液测MnP和Laccase的活性.另1个批次静置培养10d后,用木质素、纤维素和半纤维素含量定性分析方法分析测定6号菌株对麦草各组分的降解能力.

1.4 酶活性测定及降解率测定

MnP<sup>[4]</sup>:该酶活性根据37℃下NADH氧化成NAD的速率来测定.加入酶液起始反应,340nm下测定3min吸光值的变化.酶活性单位定义为1国际单位(1U)等

于每1min氧化1μmol底物或生成1μmol产物的酶量.

Laccase<sup>[5]</sup>:该酶活性根据25℃下ABTS的氧化速率来测定.加入酶液起始反应,420nm下测定3min吸光值的变化.酶活性单位定义同上.

木质素、纤维素和半纤维素含量的定量分析程序详见文献[6].

1.5 木质素降解率校正<sup>[7]</sup>

在测定木质素降解率时,考虑有部分酸溶木质素溶于硫酸造成误差,用分光光度计法进行校正.

2 结果与分析

2.1 7种因素的最佳正交综合培养条件

(1)7种因素正交实验分配与结果 第1碳源用量、培养基体积、pH值和T-80用量4种因素在单因素条件下的一定范围内,对6号菌株的产酶和降解能力都有一定的促进作用,在考虑单因子最适水平的基础上,再考察添加ABTS、温度 and 第2碳源加入时间各2种较适水平\*,按L16(4<sup>4</sup>×2<sup>3</sup>)正交实验分配表做4因素4水平3因素2水平正交综合实验,各因素水平依次分别为:第1碳源用量(蔗糖)2.1、0.5、0.1g/L;培养

表 1 4 因素 4 水平 3 因素 2 水平正交实验分配及结果

Table 1 Orthogonal experimental design disposition and result of L16(4<sup>4</sup>×2<sup>3</sup>).

| 管号 | 4 <sup>4</sup> 因素                   |           |       |            | 2 <sup>3</sup> 因素 |          |                    | Laccase<br>/<br>U·L <sup>-1</sup> | MnP<br>/<br>U·L <sup>-1</sup> | 木质素<br>降解率<br>/% | 纤维素<br>降解率<br>/% | 半纤维素<br>降解率<br>/% |
|----|-------------------------------------|-----------|-------|------------|-------------------|----------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
|    | 第1碳<br>源用量<br>/(g·L <sup>-1</sup> ) | 体积<br>/ml | pH 值  | T-80<br>/% | ABTS              | 温度<br>/℃ | 第2碳<br>源加入<br>时间/d |                                   |                               |                  |                  |                   |
| 对照 | 1                                   | 50        | ≈10.5 | 0          | 0                 | 37       | 3.5                | 1427.039                          | 420.428                       | 44.01            | 23.86            | 23.17             |
| 1  | 2                                   | 60        | 10.4  | 0.2        | 0.5               | 32       | 4                  | 2033.032                          | 619.829                       | 49.03            | 21.72            | 24.89             |
| 2  | 0.5                                 | 80        | 10.0  | 0.2        | 0                 | 37       | 4                  | 1950.479                          | 655.166                       | 48.81            | 21.10            | 24.36             |
| 3  | 1                                   | 80        | 10.4  | 0.3        | 0.5               | 37       | 3.5                | 2560.330                          | 847.067                       | 52.80            | 20.33            | 26.90             |
| 4  | 0.1                                 | 60        | 10.0  | 0.3        | 0                 | 32       | 3.5                | 1829.628                          | 722.140                       | 48.20            | 21.16            | 24.27             |
| 5  | 2                                   | 70        | 10.0  | 0.4        | 0.5               | 37       | 3.5                | 2218.094                          | 766.300                       | 51.35            | 20.52            | 26.39             |
| 6  | 0.5                                 | 50        | 10.4  | 0.4        | 0                 | 32       | 3.5                | 1942.836                          | 630.046                       | 48.64            | 21.40            | 24.44             |
| 7  | 1                                   | 50        | 10.0  | 0.1        | 0.5               | 32       | 4                  | 2045.074                          | 684.322                       | 49.30            | 21.26            | 25.11             |
| 8  | 0.1                                 | 70        | 10.4  | 0.1        | 0                 | 37       | 4                  | 1990.275                          | 703.137                       | 49.15            | 20.91            | 24.77             |
| 9  | 2                                   | 50        | 10.6  | 0.3        | 0                 | 37       | 4                  | 2300.854                          | 740.589                       | 52.21            | 20.43            | 26.50             |
| 10 | 0.5                                 | 70        | 10.2  | 0.3        | 0.5               | 32       | 4                  | 2098.466                          | 710.095                       | 49.62            | 20.75            | 25.63             |
| 11 | 1                                   | 70        | 10.6  | 0.2        | 0                 | 32       | 3.5                | 2370.793                          | 812.632                       | 52.40            | 20.39            | 26.78             |
| 12 | 0.1                                 | 50        | 10.2  | 0.2        | 0.5               | 37       | 3.5                | 2041.154                          | 736.477                       | 49.55            | 21.36            | 25.83             |
| 13 | 2                                   | 80        | 10.2  | 0.1        | 0                 | 32       | 3.5                | 2030.553                          | 728.709                       | 49.47            | 21.40            | 25.70             |
| 14 | 0.5                                 | 60        | 10.6  | 0.1        | 0.5               | 37       | 3.5                | 1977.337                          | 660.384                       | 49.22            | 21.83            | 25.08             |
| 15 | 1                                   | 60        | 10.2  | 0.4        | 0                 | 37       | 4                  | 2188.720                          | 805.119                       | 50.74            | 20.45            | 26.28             |
| 16 | 0.1                                 | 80        | 10.6  | 0.4        | 0.5               | 32       | 4                  | 1844.066                          | 600.926                       | 47.99            | 22.65            | 25.03             |

基体积50、60、70、80ml/250ml锥形瓶;pH值10.0、10.2、10.4、10.6;T-80用量0.1%、0.2%、0.3%、

\* 罗宇焯.嗜碱细菌利用复合碳源共代谢降解木质素的机理研究.武汉大学硕士论文.2000.48~56.

0.4 % ; ABTS 0 .0.5 mmol/ L ; 温度 32 ℃ 37 ℃ ; 第 2 碳源加入时间为接种后第 3.5 d .第 4 d .实验分配与结果见表 1 .

(2) 7 种因素正交实验各因子的影响趋势 经  $F$  检验 , 4 种因素对 Laccase 的影响都是极显著的(图 1 和

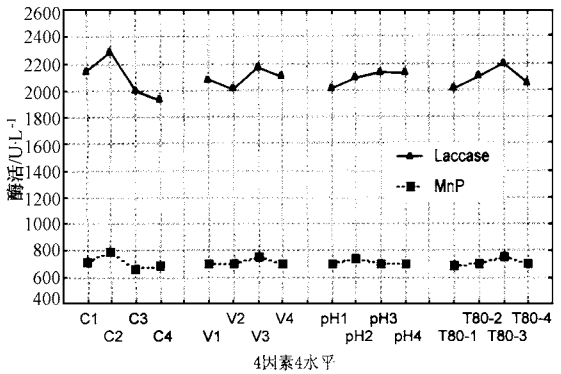


图 1 4 因素 4 水平正交实验各因子作用趋势 (酶活性)

Fig.1 Factors level average index of L16( $4^4 \times 2^3$ ) (the activities of Laccase and MnP)

图 2) ,  $F$  值均远大于  $F_{0.01}(5.29)$  , 第 1 碳源用量是最主要的影响因素 , 各因素的差异显著性依次为 : 第 1 碳源用量、T-80 用量、培养基体积、pH 值 ; 而影响 MnP 差

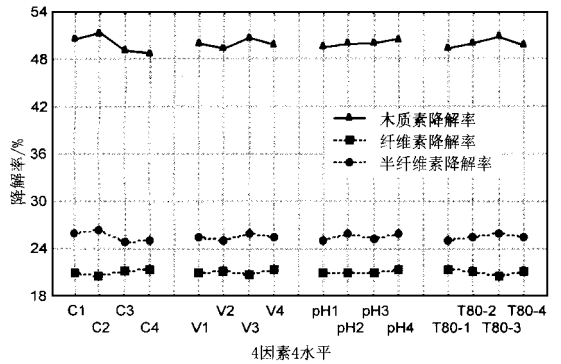


图 2 4 因素 4 水平正交实验各因子作用趋势 (降解率)  
Fig.2 Factors level average index of L16( $4^4 \times 2^3$ ) (the degradation rate of wheat straw)

异性的 4 因素中 , 各因素的差异显著性依次为 : 第 1 碳源用量、T-80 用量、培养基体积、pH 值 ; 其中第 1 碳源用量、T-80 用量、培养基体积是显著性的 ,  $F$  值均大于  $F_{0.05}(3.20)$  , 而 pH 值对 MnP 的影响则是不显著的 . 可能是因为所选取跨度的几种 pH 值下 , 2 种酶活性都较高的缘故 . 而对麦草中木质素、纤维素降解率的影响因素显著性依次为 : 第 1 碳源用量、T-80 用量、培养基体积、pH 值 ; 其中前 2 者是显著性的 , 后 2 者不显著 . 通过极差分析 , 2 水平因素中 , 37 ℃ 和接种后第 4 d 加入第 2 碳源效果较好 , ABTS 的添加与否作用不大 , 有待

表 2 4 因素 4 水平正交实验各因子水平平均指数  
Table 2 Factors levels average index of L16( $4^4 \times 2^3$ )

| 因素 <sup>1)</sup> | 第 1 碳源用量 | 体积       | pH 值     | T-80/ %  |
|------------------|----------|----------|----------|----------|
| K1               | 2145.633 | 2082.480 | 2010.819 | 2010.810 |
|                  | 713.857  | 697.859  | 706.982  | 694.138  |
|                  | 50.52    | 49.93    | 49.42    | 49.29    |
|                  | 21.02    | 21.11    | 21.01    | 21.35    |
| K2               | 2291.229 | 2007.179 | 2089.723 | 2098.865 |
|                  | 787.285  | 701.868  | 745.100  | 706.026  |
|                  | 51.31    | 49.30    | 49.85    | 49.95    |
|                  | 20.61    | 21.29    | 20.99    | 21.14    |
| K3               | 26.27    | 25.13    | 25.86    | 25.47    |
|                  | 1992.280 | 2169.407 | 2131.618 | 2197.320 |
|                  | 663.923  | 748.041  | 700.020  | 754.973  |
|                  | 49.07    | 50.63    | 49.91    | 50.71    |
| K4               | 21.27    | 20.64    | 21.09    | 20.67    |
|                  | 24.88    | 25.89    | 25.25    | 25.83    |
|                  | 1926.281 | 2096.357 | 2123.263 | 2048.429 |
|                  | 690.670  | 707.967  | 703.633  | 700.598  |
|                  | 48.72    | 49.77    | 50.46    | 49.68    |
|                  | 21.52    | 21.37    | 21.33    | 21.26    |
|                  | 24.98    | 25.50    | 25.85    | 25.54    |

1) K 表示各因素相同水平的平均指标(从上至下依次为 Laccase、MnP,单位:  $U \cdot L^{-1}$ ; 木质素降解率、纤维素降解率、半纤维素降解率,单位: %)

继续研究.

从 4 种因素各水平的平均指数(表 2)可知,最佳 Laccase 产酶条件和最佳 MnP 产酶条件的 4 因素水平是非常接近的,仅在初始 pH 值上有差别,分别为 10.2 和 10.6,而经 Q 检验,这 2 种水平对 Laccase 和 MnP 影响的差异性都不显著,且 pH10.6 更接近基础培养液的 pH 值,因而可使用 pH10.6.

2.2 7 种因素综合培养条件下 6 号菌株的产酶及降解能力

选用以上研究的 7 种因素最适综合培养条件结合对照组进行验证实验来考察菌株的产酶及降解能力(表 3),结果表明,7 种因素最适综合培养条件下 Laccase 和 MnP 的酶活性都远高于对照组,其中 Laccase 和 MnP 的活性分别提高到 1.820 倍和 2.210 倍.添加 ABTS 时酶活性仅略有提高(2 种酶活性分别提高到 1.837 倍和 2.257 倍),不添加与添加 ABTS 的最佳综合培养条件下,麦草中木质素降解率分别提高了 8.79 %和 8.93 %,可以看出添加 ABTS 其效果并不明显,考虑未来工业应用的成本因素,选择最适综合培养条件中不添加 ABTS.

表 3 综合培养条件下 6 号菌株的产酶及降解能力

| 培养条件                       | 对照       | 4 因素最适综合条件 |          |
|----------------------------|----------|------------|----------|
|                            |          | 不加 ABTS    | 加 ABTS   |
| Laccase/ U·L <sup>-1</sup> | 1411.775 | 2569.431   | 2593.257 |
| MnP/ U·L <sup>-1</sup>     | 436.542  | 964.758    | 985.306  |
| 木质素降解率校准值/ %               | 38.08    | 46.87      | 47.01    |
| 木质素降解率/ %                  | 43.33    | 53.33      | 53.49    |
| 纤维素降解率/ %                  | 24.20    | 20.31      | 20.39    |
| 半纤维素降解率/ %                 | 23.19    | 26.98      | 27.15    |

3 结论

7 种单因素 L16(4<sup>4</sup> × 2<sup>3</sup>) 综合正交实验表明,各单因素对 Laccase 和 MnP 及降解麦草各组分的趋势是基本一致的,但影响程度各有不同.分析正交结果,经 F 检验,在对 Laccase、MnP、麦草中木质素降解率和纤维素降解率的影响上,第 1 碳源用量和 T-80 用量是最显著的影响因素.在综合正交的交互作用下,结合各水平间差异性 Q 检验的结果,影响 6 号菌株产酶及降解能力的这 7 种单因素的综合水平为:37℃ 静置培养 10d、第 1 碳源(蔗糖)1g/L、氮源 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>1.2g/L、培养基 70 ml/250 ml 锥形瓶、初始 pH 值 10.6、第 2 碳源接种后第 4d 加入、添加 0.3 %的表面活性剂 T-80.

参考文献:

1 管筱武,张甲耀,罗宇煊.木质素降解酶及其调控机理研究的进展.上海环境科学,1998,17(11):46~49.

2 管筱武,张甲耀,罗宇煊等.嗜碱木素降解菌产酶条件的初步研究.化学通报网络版,1999, No.99140.

3 罗宇煊,张甲耀,管筱武等.嗜碱细菌降解木质素的复合碳源共代谢研究 I——复合碳源组合方式及氮源的选择.城市环境与城市生态,2000,13(2):8~10.

4 Leontievsky A A, Myasodova N M, Golovleva A. Production of Ligninolytic Enzymes of the White Rot Fungus *Panus tigrinus*. J. Biotechnol., 1994, 32:299~307.

5 Brian P Roy, Frederick Archibald. Effect of Kraft Pulp and Lignin on *Trametes versicolor* Carbon Metabolism. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(6):1855~1863.

6 王玉万,徐文玉.木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序.微生物学通报,1987,14(2):81~84.

7 屈维均,陈佩蓉,何福望编.制浆造纸实验.北京:中国轻工业出版社,1992.253~255.